EFECTO DE LA APLICACIÓN DE AZOTOBACTER CHROOCOCCUM Y BACILLUS MEGATHERIUM *VAR.* PHOSPHATICUM *SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLÁNTULAS DE TABACO CULTIVADAS EN SEMILLEROS TECNIFICADOS*

Yarilis León González[1], Rafael Martínez Viera[2], Juan Miguel Hernández Martínez[1] y Yoanna Cruz Hernández[1]
[1] Estación Experimental del Tabaco. Finca Vivero, San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba
[2] Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt

RESUMEN

Durante la campaña tabacalera 2008/2009 se realizó un experimento en la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, Pinar del Río, con el objetivo de conocer el efecto de la aplicación de biofertilizantes a base de la bacteria fijadora de dinitrógeno atmosférico Azotobacter chroococcum *y su combinación con la bacteria solubilizadora del fósforo del suelo* Bacillus megatherium *var.* phosphaticum *sobre las características morfológicas de las plántulas de tabaco obtenidas en semilleros tecnificados. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, con un modelo trifactorial, tres réplicas y 18 tratamientos, los cuales se formaron a partir de la combinación de dos niveles de fertilizante nitrogenado (100 % y 75 % del fertilizante total), tres niveles de fertilizante fosfórico (100 %, 75 % y 50 % del total a aplicar), y dos biofertilizantes Dimargón (*Azotobacter chroococcum*) y Azomeg (*A. chroococcum + Bacillus megatherium *var.* phosphaticum*). Los resultados mostraron que con la utilización de los biofertilizantes mejoraron las características morfofisiológicas de las plántulas, tales como la longitud, el diámetro del tallo, la masa fresca y seca total y el área foliar. Además, la utilización de estos bioproductos permite reducir la dosis de fertilizante químico nitrogenado y fosfórico en 25 % y 50 % respectivamente.*
Palabras claves*: Tabaco, semillero, biofertilizante,* Azotobacter chroococcum y Bacillus megatherium*.*

ABSTRACT

EFFECT OF AZOTOBACTER CHROOCOCCUM *AND* BACILLUS MEGATHERIUM *VAR.* PHOSPHATICUM *ON THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE TOBACCO SEEDLINGS OBTAINED ON TECNIFIED CONDITIONS*

During the tobacco crop 2008/2009 an experiment was carried out at the Experimental Tobacco Station in San Juan y Martínez, Pinar del Río, with the objective of knowing the effect of biofertilizers's application on the basis of atmospheric dinitrogenate fixative bacteria Azotobacter chroococcum *and its combination with the phosphate solubilizing bacteria* Bacillus megatherium *var.* phosphaticum *on the morphologic characteristics of the tobacco seedling obtained in tecnific seedlings. A random block was design with eighteen*

*treatments distributed in three repetitions. The treatments were formed from the combination of two doses of nitrogenate fertilizer (100 % and 75 % of the total fertilizer), three doses of phosphorous fertilizer (100 %, 75 % and 50 % of the total to apply) and two biofertilizer Dimargón (*Azotobacter chroococcum*) and Azomeg (*A. chroococcum + Bacillus megatherium *var* phosphaticum.*). Results showed that the morphologic characteristics of the seedlings, such as the steam diameter and steam longitude, the total fresh and dry mass and the surface of the leaves got better with the biofertilizer's utilization. Besides with these biofertilizer's utilization the chemical- fertilizer nitrogenated and phosphorous dose can decrease in a 25 % and a 50 % respectively.*

***Key words**: Tobacco, seedbed, biofertilizer,* Azotobacter chroococcum Bacillus megatherium.

INTRODUCCIÓN

La utilización de los microorganismos del suelo constituye una de las alternativas nutricionales más aceptadas dentro del contexto agrícola mundial y desempeña un papel importante no sólo en los modelos de agricultura sostenible, donde su aplicación es imprescindible, sino también, dentro de los sistemas agrícolas de alta productividad, debido a su bajo costo de producción y la posibilidad de su reproducción a partir de recursos locales renovables (Altieri, 1997).

Un aspecto muy importante que debe profundizarse en las investigaciones sobre microorganismos biofertilizantes es el que corresponde a la obtención de inoculantes mixtos, (Dibut, 2003), que contengan organismos capaces de realizar distintas funciones con alta efectividad, lo cual puede simplificar las aplicaciones y reducir el costo de los productos. Pero en el mundo se han realizado escasos estudios en relación con la inoculación simultánea de varios microorganismos, gran parte de los cuales, además, no han rebasado el nivel de los suelos esterilizados, lo que aleja a estos estudios de la práctica agrícola (Lino *et al*., 2004).

En 1993, Abbass and Okon estudiaron el efecto de la inoculación simultánea de *Rhizobium y Bacillus megatherium* var*. phosphaticum* sobre el rendimiento de algunos cultivos y reportaron un incremento superior a los que se lograban con la inoculación independiente.

Autores como Pacovsky (1986) y Subba Rao (1996) han planteado que el suplemento de fósforo aportado por los solubilizadores puede contribuir a incrementar la eficiencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Así, en inoculaciones conjuntas de *Azotobacter chroococcum, B. megatherium y Pseudomonas fluorescens* a varias especies hortícolas se encontró un notable incremento del rendimiento (Azcón *et al*., 1975).

Para aprovechar estos conocimientos, se realizó un experimento con el objetivo de evaluar el efecto de las aplicaciones de *Azotobacter chroococcum y Bacillus megatherium* var*. phosphaticum* sobre las características morfofisiológicas de las plántulas de tabaco cultivadas en semilleros tecnificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, Pinar del Río, durante la campaña tabacalera 2008/2009. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con un modelo trifactorial, tres réplicas y 18 tratamientos, resultantes de la combinación de dos niveles de fertilizante nitrogenado (100 % y 75 % del fertilizante total), tres niveles de fertilizante fosfórico (100 %, 75 % y 50 % del total a aplicar), un biofertilizante simple a base de la cepa INIFAT-12 de *Azotobacter chroococcum* con el nombre comercial de Dimargón y la mezcla de este

con el *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* con el nombre comercial de Azomeg.

Los tratamientos fueron:
1- 100 % N+ 100 % P (variante testigo)
2- 100 % N+ 100 % P+ *Azotobacter*
3- 100 % N+ 100 % P + *Azotobacter* + *Bacillus meg*.
4- 100 % N+ 75 % P
5- 100 % N+ 75 % P + *Azotobacter*
6- 100 % N+ 75 % P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg*.
7- 100 % N + 50 % P
8- 100 % N+ 50 % P + *Azotobacter*
9- 100 % N + 50 % P + *Azotobacter*+ *Bacillus Meg*
10. 75 % N+ 100 % P
11. 75 % N+ 100 % P+ *Azotobacter*
12. 75 % N+ 100 % P + *Azotobacter* + *Bacillus meg*.
13. 75 % N+ 75 % P
14. 75 % N+ 75 % P + *Azotobacter*
15. 75 % N+ 75 % P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg*.
16. 75 % N + 50 % P
17. 75 % N+ 50 % P + *Azotobacter*
18. 75 % N + 50 % P + *Azotobacter*+ *Bacillus meg*

Las dosis a aplicar de los biofertilizantes fue de 3 L/ha para el *Azotobacter* y de 2 L/ha para el *Bacillus*; estos se inocularon en el momento de la siembra y antes del riego por aspersión y se aplicaron con una concentración de 10^{13} UFC/ ml.

Se utilizaron como portadores para la aplicación de fertilizante mineral: nitrato de amonio, super fosfato sencillo, sulfato de potasio y sulfato de magnesio. En todos los casos en la fertilización mineral el potasio y el magnesio se aplicaron según la dosis recomendada en el Manual técnico para la producción de plántulas de tabaco negro (MINAG, 2001). Se tomaron 20 plantas al azar en cada variante a los 45 días después de la germinación y a cada una de ellas se le realizaron las siguientes observaciones y mediciones según metodología descrita por Fristyk (1969).

1. Diámetro del tallo (mm), con pie de rey de precisión ± 0.01 mm
2. Longitud del tallo (cm), con regla graduada de precisión ±0.1mm
3. Masa fresca y seca total (g), método gravimétrico, en balanza analítica de precisión ±0.1mg
4. Población de *Azotobacter* en la zona rizosférica, mediante el conteo de viable o UFC de *Azotobacter* en placas con el medio ASBHY
5. Área Foliar (dm^2) método gravimétrico, en balanza analítica de precisión ±0.1mg
6. Clorofila (SPAD)

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza de clasificación doble y la comparación entre las medias se realizó por la prueba de rangos múltiples de Duncan con una probabilidad del error menor o igual a 0.05 (Lerch, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Efecto de las combinaciones de los biofertilizantes con la fertilización mineral en las características morfológicas de las plántulas de tabaco.

Tratamientos	Longitud del tallo (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Masa fresca total (g)	Masa seca total (g)	Área foliar **(dm^2)**	Población de *Azotobacter* en la rizósfera	Clorofila (SPAD)
100 % N+ 100 % P	13,43 abc	3,63 abc	26,93 bcd	1,83 bc	1,63 d	$2x10^4$	31,26 bc
100 % N+ 100 % P+ *Azotobacter*	12,93 abcd	3,60 abcd	27,53 bc	1,83 bc	2,99 abc	$8x10^6$	30,10 de
100 % N+ 100 % P + *Azotob. + Bac. Meg*	12,22 cde	3,37 bcd	29,10 b	2,00 b	2,76 bc	$1.5x10^7$	31,71 ab
100 % N+ 75 % P	10,99 efgh	3,37 bcd	24,53 cdef	1,67 cde	2,95 bc	$1x10^5$	31,49 b
100 % N+ 75 % P + *Azotobacter*	12,40 bcd	3,31 de	24,93 cdef	1,50 de	2,54 c	$4x10^6$	30,56 cd
100 % N+ 75 % P + *Azotob. + Bac. meg.*	11,90 def	3,39 bcd	22,07 fg	1,43 ef	2,94 bc	$2.2x10^7$	29,87 de
100 % N + 50 % P	8,70 i	3,05 e	16,50 h	1,13 g	2,79 bc	$6x10^4$	29,30 fg
100 % N + 50 % P + *Azotobacter*	11,71 defg	3,31 de	35,43 a	2,47 a	3,08 abc	$9x10^6$	29,45 efg
100 % N + 50 % P + *Azotob. + Bac. Meg*	13,87 a	3,41 abcd	24,23 cdef	1,87 bc	3,34 ab	$7x10^6$	30,96 bc
10- 75 % N+ 100 % P	10,40 ghi	3,32 cde	24,93 cdef	1,70 bcde	2,76 bc	$3x10^4$	28,33hi
75 % N+ 100 % P+ *Azotobacter*	10,07 hi	3,67 ab	23,40 ef	1,73 bcde	1,99 d	$8x10^6$	32,27 a
75 % N+ 100 % P + *Azotob + Bac. meg.*	13,67 ab	3,54 abcd	20,20 bg	1,47 de	3,02 abc	$8x10^6$	28,17 i
75 % N+ 75 % P	11,03 efgh	3,29 de	27,10 bcd	1,83 bc	2,75 bc	$6x10^5$	28,99 gh
75 % N+ 75 % P + *Azotobacter*	12,47 abcd	3,40 abcd	26,63 bcde	1,87 bc	2,81 bc	$7x10^6$	29,29 fg
75 % N+ 75 % P + *Azotob.+ Bac. Meg*	13,42 abc	3,41 abcd	17,03 h	1,16 fg	2,92 bc	$3x10^6$	32,31 a
75 % N + 50 % P	10,67 fgh	3,05 e	27,00 bcd	1,77 bcd	2,81 bc	$1x10^5$	28,39 hi
75 % N+ 50 % P + *Azotobacter*	10,53 fgh	3,44 abcd	23,63 def	1,87 bc	3,32 ab	$8x10^6$	29,35 efg
75 % N + 50 % P + *Azotob. + Bac. Meg*	12,73 abcd	3,70 a	26,93 bcd	1,73 bcde	3,55 a	$9x10^6$	28,83 ghi
(Esx(±))	0,437	0,092	1,035	0,096	1,741	**-**	0,251
CV (%)	17,81	11,42	18,17	19,23	17,81	-	4.59

Como puede apreciarse en la tabla 1, en las características analizadas para todos los tratamientos donde no hubo diferencia con la variante testigo, estuvo presente un biofertilizante, ya sea *Azotobacter* solo o mezclado con el *Bacillus.* Es de destacar que aún disminuyendo la dosis de fertilizante nitrogenado y fosfórico en 25 % o 50 % según sea el caso, se obtuvieron resultados satisfactorios sin diferencias estadísticas con el tratamiento testigo, lo que constituye un resultado muy importante para el cultivo del tabaco, el cual es muy exigente a la fertilización mineral y con la utilización de los biofertilizantes se pueden dar pasos de avance en vías de la sustentabilidad de los sistemas agrícolas tabacaleros (Martínez Viera, 2006).

En lo que respecta a la longitud del tallo, los mejores resultados corresponden a las variantes 9, 12 y 15, las cuales contienen las dos bacterias y reducción de 25 % de nitrógeno y 25 % - 50 % de fósforo. En el diámetro del tallo se aprecian los mejores resultados en las variantes 11 y 18, las cuales sólo tienen *Azotobacter* y se les redujo 25 % de fertilizante nitrogenado. La masa fresca y seca son extraordinariamente influidas por las sustancias activas sintetizadas por *Azotobacter* y puede reducirse la cantidad necesaria de fósforo. En este caso la mejor variante fue 100 % N + 50 % P + *Azotobacter,* con diferencias estadísticas para el resto de los tratamientos.

El área foliar es estimulada principalmente en las variantes 9, 17 y 18, dos de estos tratamientos con la participación conjunta de ambas bacterias y la reducción de 25 % de nitrógeno y 50 % de fósforo. Esto es un indicador importante en las plántulas ya que el área foliar está relacionada directamente con la actividad fotosintética, que es la función fundamental de las hojas en las plantas. Los tratamientos con mayor contenido de clorofila fueron 3, 11 y 15 los cuales, excepto el 11, tienen a las dos bacterias y una reducción en el tratamiento 15 de 25 % de fósforo y nitrógeno, aunque en sentido general el contenido de clorofila es bajo según Izquierdo *et al*. (2007) y Blandon (2008) los cuales determinaron que los niveles de clorofila en el momento del trasplante deben ser de 35 a 37 SPAD.

Sin embargo, estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores como Dobbelaere *et al*., (2003) y Martínez Viera (2007) en investigaciones que han demostrado la capacidad de los microorganismos de fijar en la rizosfera el nitrógeno atmosférico, solubilizar el fósforo fijado en el suelo, movilizar macro y micronutrientes a través de la mineralización, sintetizar sustancias con características antibióticas o de biocontrol, estimular la formación de agregados en el suelo y otras funciones fisiológico-bioquímicas que se realizan por la asociación microorganismos-raíces en las más variadas especies de plantas con una amplia diversidad genética.

En el caso del *Azotobacter*, se pone de manifiesto la reducción de la población en función del tiempo en la zona rizosférica de las plantas, lo cual está en correspondencia con lo planteado por Martínez Viera *et al*. (2004), quienes demostraron que en las condiciones tropicales de Cuba, y en diversos cultivos como la papa, el pepino y el tomate, las poblaciones de *Azotobacter chroococcum*, cuyos niveles después de la inoculación, equivalen aproximadamente a 10^9 células/g de suelo rizosférico, recuperan su nivel natural (10^4-10^5) en un período máximo de 4 meses, según el cultivo. Es decir, que no hay contaminación a largo plazo, debido al empobrecimiento de las secreciones radiculares por el envejecimiento de las plantas y al antagonismo de otras poblaciones microbianas del suelo.

En el caso de los tratamientos donde se utilizó el inoculante mixto se corroboran los resultados obtenidos por Martínez Viera y Dibut (2006) y Dibut *et al*. (2009) en cuanto a la coinoculación con las bacterias *Azotobacter*

chroococcum y Bacillus megatherium var. *phosphaticum*, los cuales lograron una estimulación entre el 9 % y el 53 % los diferentes indicadores del crecimiento y desarrollo de los cultivos de tomate, zanahoria, lechuga y remolacha.

CONCLUSIONES

• Las mejores variantes en todas las observaciones realizadas resultaron ser (8) 100 % N + 50 % P + *Azotobacter*; (9) 100 % N + 50 % P + *Azotob. + Bac. Meg;* (12) 75 % N+ 100 % P + *Azotobacter;* (15) 75 % N+ 75 % P + *Azotob.*+ *Bac. Meg* y (18) 75 % N + 50 % P + *Azotob.* + *Bac. Meg.*

• Con la inoculación del *Azotobacter chroococcum* y la co-inoculación de este con el *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* se mejoraron las características morfofisilológicas de las plántulas, tales como la longitud y el diámetro del tallo, la masa fresca y seca total y el área foliar.

• Con la utilización de estos biofertilizantes se puede disminuir la dosis de fertilizante mineral nitrogenado y fosfórico en un 25 % y un 50 % respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

Abbass, Z. and Y. Okon: Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 25(8):1075-1083, 1993.

Altieri, M. A.: *Agroecología. Bases Científicas para una agricultura sustentable*. 249 pp., Ed. CLADES. ACAO, La Habana, 1997.

Azcón, R., M. Gómez y J. M. Barea: Efectos de la aplicación conjunta de fertilizantes químicos y microbianos en cultivos enarenados. *An. De Edafología y Agrobiología*, 33 (9-10): 863- 870. 1975.

Blandon López, Y.: Combinación de microelementos-magnesio con albúmina-sacarosa en la producción de propágulos en canteros tecnificados, con sustrato de residuos de pino. Trabajo de Diploma Facultad de Forestal y Agronomía, Departamento de Producción Agropecuaria. Hnos. Saiz Montes de Oca, 2008.

Dibut Álvares, B.: Biofertilización: biotecnología indispensable para el desarrollo de la agricultura sostenible. En: *Memorias III Congreso Internacional de Biotecnologías para la Región Latinoamericana* (CINBIOS); Yucatán. 2003.

Dibut Álvares, B., R. Martínez Viera, M. García; Y. Ríos, R. García, G. Tejeda, L. Plana, Y. Rodríguez, L. Fey, U. Soca, E. Mesa: Introducción en la práctica agrícola de un nuevo biopreparado mixto para el beneficio de cultivos hortícolas de importancia económica. En: *Memorias de la XII Jornada Científica por el 105 Aniversario de la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas. INIFAT*, 2009.

Dobbelaere, S., A. Croonenborghs and A. Tiss: Azospirillum. *Aust. J.Plant Physiol*., 28 :871-879. 2003.

Fristyk, A.: *Selección y ennoblecimiento de las variedades de Tabaco. Capitulo II: Semillería en el Tabaco*, Ciencia y Técnica Instituto del Libro, La Habana, 1era edición, pp., 69-94, 1969.

Izquierdo Medina, A., B. García, N. Rodríguez y Y. León: Influencia de los portadores nitrogenados en la incidencia de las manchas del tabaco seco y en las características agroproductivas del cultivo del tabaco bajo tela. L-3-08. Instituto de Investigaciones del Tabaco. 2007.

Lino A., N. Arozarena, N.; B. Dibut , Y. Ríos, J. Fernández, Ramos, H., Creacgh.:

Evaluación de la aplicación conjunta de biofertilizantes en el cultivo del tomate (*Solanum Lycopersicum*, L.): En: *Congreso Científico del INCA* (14: 2004, nov. 9-12; La Habana). Memorias CD-ROOM Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2004.

Lerch, G. *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*, 452 pp., Ed Científico Técnica, La Habana, 1977.

Martínez Viera, R., B. Dibut, G. Tejeda y R. García: Reducción de la fertilización nitrogenada en distintos cultivos económicos mediante la aplicación de biofertilizantes. En: *Memorias del Congreso «Trópico* 2004», La Habana, 2004.

Martínez, Viera R.: La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en el medio tropical. Ministerio de Agricultura y Tierras, Caracas, Venezuela, 183 pp., 2007.

Martínez Viera, R.: *Los biofertilizantes y bioestimuladores bacterianos como pilares básicos de la Agroecología*, 35 pp., Ed. CIARA, Caracas, 2006.

Martínez Viera, R., y B. Dibut: Practical applications of Bacterial Biofertilizers and Biostimulators. En *Biological Approachs to Sustainable Soil Systems*, Francis and Taylor Publ., Nueva York, pp. 467-477. 2006.

Ministerio de la Agricultura. Cuba. Dirección Nacional de Tabaco.: *Manual técnico para la producción de posturas de tabaco*, Ed. AGRINFOR, La Habana, 2001.

Pacovsky, R.S.: Micronutrient uptake and distribution in mycorhizal or phosphorus-fertilized soybeans. *Plant and Soil*, 95 (3): 379-388. 1986.

Subba Rao, N.S.: Interaction of nitrogen-fixing microorganisms with other soil microorganisms. In: *Biological Nitrogen Fixation*, Ed. Marcel Dekker, Nueva York, pp 37-63. 1996.